

QUELQUES ASPECTS DE LA LYOPHILISATION DU POLLEN DE COCOTIER

G. BÉNARD

Département Cocotier de P. I. R. H. O.

A. — INTRODUCTION

La conservation du pollen de cocotier est indispensable à la bonne exécution des programmes d'améliorations génétiques. Elle rend possible les autofécondations (1) et permet par ailleurs de croiser des arbres qui ne fleurissent pas au même moment ou qui sont éloignés les uns des autres.

Après avoir passé en revue les techniques actuelles de conservation du pollen, une méthode nouvelle est étudiée : la lyophilisation.

B. — LES TECHNIQUES ACTUELLES DE RÉCOLTE ET DE CONSERVATION DU POLLEN

Les fleurs mâles situées sur les mêmes spadices que les fleurs femelles ont une anthèse étalée qui peut durer 2 à 3 semaines. La cueillette des épis a lieu au début de la floraison, dans les 4 ou 5 jours qui suivent l'ouverture de la spathe externe [1]. La partie mâle du spadice est coupée un peu au-dessus des dernières fleurs femelles. Les fleurs détachées sont placées dans une étuve à 40° pendant 24 heures, puis grossièrement écrasées. Le pollen tamisé sur toile métallique de 8 à 10 mailles au mm est mis en tubes de verre en unité de 0,25 g et séché sous l'effet du vide selon la méthode de Whitehead [2].

On peut remplacer le passage à l'étuve par une dessiccation sur silicagel des fleurs mâles sectionnées à leur tiers inférieur.

Dans tous les cas, les durées de stockage sont courtes, de l'ordre de un à quelques mois. Un froid de — 20° améliore la conservation.

L'observation du pouvoir germinatif permet de contrôler la qualité des pollens.

On teste le pouvoir germinatif des pollens sur un milieu gélosé sucré (1,2 p. 100 de gélose + 11 p. 100 de saccharose). Après 2 heures d'incubation à 35° en atmosphère saturée, on établit le pourcentage de grains germés par observation au microscope de 4 ou 5 champs différents totalisant au moins une centaine de grains.

On admet que le pourcentage de germination d'un pollen de cocotier dont le pouvoir germinatif est naturellement peu élevé est en relation stricte avec le pouvoir fécondant et la qualité de semences. Un pollen qui germe bien a un bon pouvoir fécondant et donne des semences de qualité.

C. — LA LYOPHILISATION

La nécessité de conserver les pollens longtemps sans les stocker à basse température a orienté les recherches vers la lyophilisation.

La lyophilisation est, d'après Picault [3], un procédé de conservation qui permet en éliminant le solvant, l'eau en général, des produits, **d'obtenir un extrait sec** qui se conserve à la température ambiante. Cet extrait remis en présence de son solvant reconstituera un **produit identique** à celui traité. L'élimination de l'eau s'effectue par sublimation grâce à l'action simultanée du froid et du vide, puis par désorption sous l'action du vide aussi poussé que possible.

Techniques et méthodes.

La lyophilisation comprend 3 phases successives :

- la **congélation** qui est la solidification par le froid de la phase aqueuse des tissus,
- la **sublimation** qui est le passage de l'eau libre de l'état solide à l'état de vapeur,
- la **désorption** qui est l'élimination des molécules

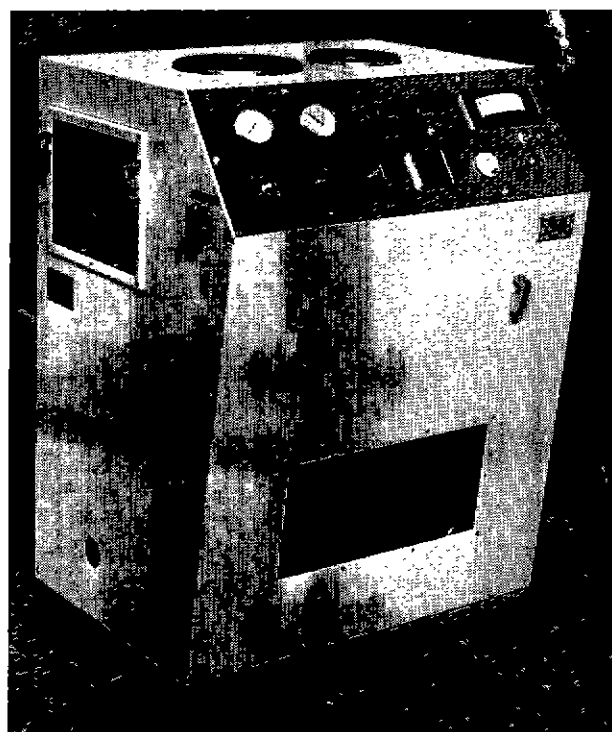


FIG. 1. — Lyophilisateur type Piccolo à — 80 °C.

(Photo Photolac, Paris)

(1) Le cocotier est généralement allogame, les fleurs femelles sont réceptives lorsque l'anthèse mâle est terminée. Les cocotiers nains font exception : ils s'autofécondent naturellement.

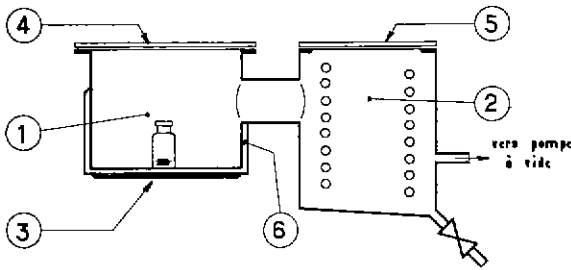


Fig. 2. — Lyophilisateur vu en coupe.

1 : Cuve de congélation et de sublimation. 2 : Piège qui peut être refroidi à -100°C . 3 : Élément chauffant. 4, 5 : Hublot de fermeture en verre « Securit transparent ». 6 : Éléments de congélation (-80°C en cours de fonctionnement).

d'eau retenues par adsorption sur le produit apparemment sec.

Dans la plupart de nos expériences, nous avons utilisé le lyophilisateur « Piccolo » (Fig. 1) construit par la Société d'Etudes et de Réalisations d'Appareils Industriels et de Laboratoire (SERAIL). Il est composé (Fig. 2) :

— d'une chambre de congélation et de sublimation verticale de 180 mm de diamètre et 150 mm de profondeur et ayant une capacité de chargement de 48 flacons de 8 ml, \varnothing 22,4. Cette chambre qui repose sur un élément chauffant est munie d'un raccord latéral par lequel on peut faire pénétrer un gaz neutre ;

— d'un piège destiné à recevoir l'eau sublimée à la surface d'un serpentín. Ce piège est relié à une pompe à vide permettant d'obtenir une très basse pression (4.10^{-3} Torr).

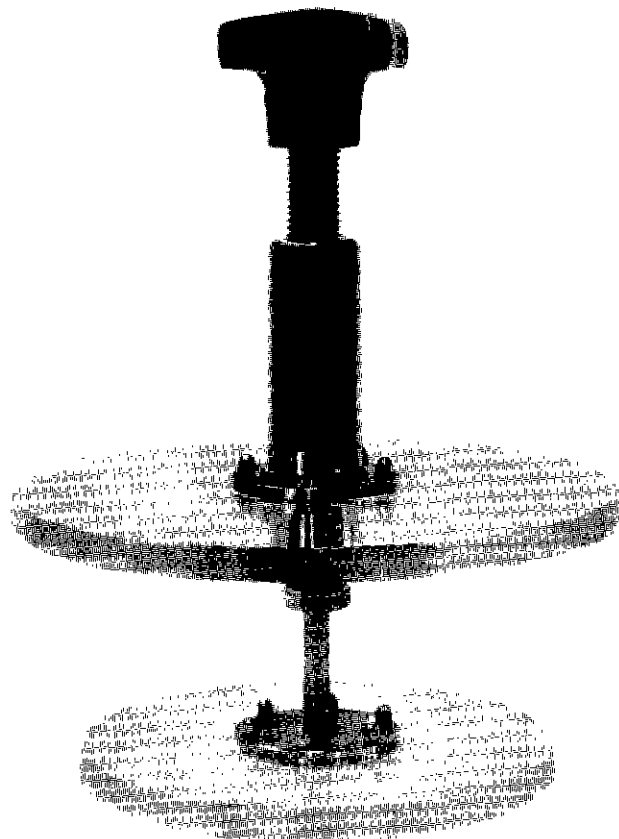


Fig. 3. — Dispositif de bouchage sous vide.

En exerçant une rotation sur la poignée, les bouchons cannelés s'enfoncent dans les flacons.

L'appareil spécialement équipé en version « basses températures » permet une congélation ultra rapide : le froid est de -80°C en congélation et de -100°C à la surface du piège en fin d'opération.

Les hublots de fermeture sont en verre « Securit transparent », la chambre de congélation peut être équipée d'un dispositif de bouchage sous atmosphère contrôlée (Fig. 3). On utilise alors des bouchons cannelés qui, par leur forme particulière, permettent la sublimation à travers leurs cannelures. On peut en fin d'opération procéder à un bouchage sous vide ou en présence d'un gaz neutre.

Nous analyserons séparément les conditions de congélation et de déshydratation.

Les températures de congélation.

Les essais ci-après, réalisés sur pollen de cocotier, mettent en évidence que les températures très basses, appliquées brutalement, n'ont apparemment aucune incidence sur la viabilité du pollen.

Quatre types de traitements ont été expérimentés :

A. — Pollen partiellement séché, lyophilisé dans un appareil qui ne produit pas un froid poussé, pendant 17 heures.

B. — Pollen encore en sacs polliniques, lyophilisé pendant 17 heures.

C. — Pollen partiellement séché soumis pendant 3 jours à -196°C dans de l'azote liquide.

D. — Témoin : pollen partiellement séché ne subissant aucun autre traitement.

Les pollens A et B, mis dans différentes conditions de réhydratation, ne germent pas. Le pollen C germe aussi bien que le témoin.

Ainsi un froid brutal et poussé, appliqué pendant des dizaines d'heures, n'altère pas la viabilité des pollens. On ne peut cependant pas savoir si l'absence de germination des pollens A et B provient d'une congélation trop lente ou imparfaite (la température n'a pas été notée), d'une mauvaise sublimation ou d'une altération de la viabilité au cours de la désorption.

Les seuils de température de congélation, à partir desquels commence la sublimation, peuvent être déterminés expérimentalement en traçant, au cours de la lyophilisation, les courbes de réchauffement. On admet généralement que cette température est inférieure de 10° environ à celle de la décongélation commençante.

La figure 4 indique que, pour un pollen de cocotier déshydraté pendant 24 heures dans une étuve à 40° ventilée, l'amorce du palier de décongélation, peu précise il est vrai car observée sur un thermomètre à alcool placé au contact du pollen, se situe aux environs de -30°C . Il est donc nécessaire, pour obtenir une bonne lyophilisation, de produire une température inférieure à -40°C en congélation.

Le rôle joué par la vitesse de congélation n'a pas été déterminé, mais qu'une température de -196°C appliquée brutalement ne soit pas mortelle est la preuve qu'une congélation rapide est sans inconvénient. C'est pourquoi, dans la plupart de nos expériences, le pollen à traiter est mis directement au contact de parois à -80°C , qu'il s'agisse du fond de la cuve de sublimation ou de flacons préalablement refroidis.

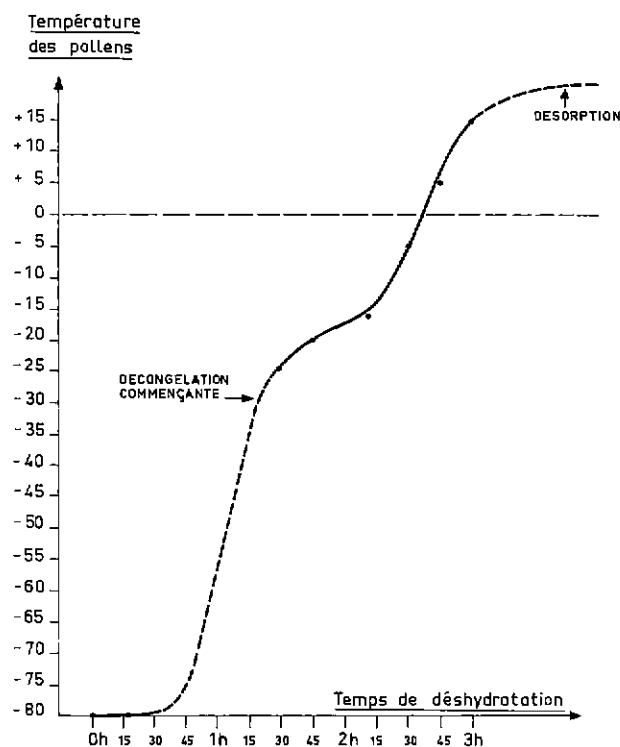


FIG. 4. — Courbe de réchauffement du pollen lors de la lyophilisation.

Le test suivant montre qu'en adoptant cette température de congélation de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, les pollens traités conservent leur pouvoir germinatif.

Le tableau I résume les résultats obtenus avec un pollen de cocotier soumis à trois traitements :

A. — Lyophilisation : congélation à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (pendant 1/4 h) puis déshydratation pendant 1 heure.

B. — Séchage sous vide sans congélation.

C. — Témoin : pollen conditionné de façon standard.

TABLEAU I

Evolution du pouvoir germinatif d'un pollen de cocotier en fonction du temps de stockage

Traitement	A. — Pollen lyophilisé	B. — Pollen séché sous vide	C. — Témoin
Stockage			
15 j à $(+20, +25\text{ }^{\circ}\text{C})$	32	8	35
15 j à $(+20, +25\text{ }^{\circ}\text{C})$ puis 30 j à $+35\text{ }^{\circ}\text{C}$..	24	9	0
6 mois à $(+20, +30\text{ }^{\circ}\text{C})$	28	0	Non testé

Le pollen lyophilisé A garde une viabilité comparable à la viabilité de départ malgré les très mauvaises conditions de conservation (stockage à $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 1 mois ou stockage pendant 6 mois à des températures comprises entre 20° et $30\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Le pollen B non congelé ne peut pas se conserver 6 mois.

Le pollen témoin ne germe plus après un passage à l'étuve à $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 1 mois.

Ainsi, en l'absence de congélation, les pollens ne résistent pas à des conservations de longue durée.

Les conditions de déshydratation.

Le facteur durée de déshydratation a été étudié dans plusieurs expériences de lyophilisation.

Le tableau II compare sur deux pollens l'effet du temps de déshydratation.

TABLEAU II

Pourcentage de germination de deux pollens de cocotier lyophilisés et stockés à température ambiante pendant 5 mois 1/2

Pollen	Durée de déshydratation	1 ^{er} contrôle	2 ^e contrôle	Moyennes
Pollen 1 ..	3 heures	34,1	50,4	42,2
	5 heures	9,0	14,0	11,5
	9 heures	0	0	0
Pollen 2 ..	3 heures	29,5	29,2	29,3
	5 heures	4,0	6,6	5,3
	9 heures	0	0	0

Il apparaît ainsi qu'un pollen lyophilisé pendant 3 heures garde une bonne viabilité après un stockage de 5 mois et demi à température ambiante ($T = 20$ à $30\text{ }^{\circ}\text{C}$).

On altère cette viabilité lorsque l'on prolonge le séchage sous vide pendant 2 heures supplémentaires, on la supprime totalement en déshydratant trop longtemps.

Nous verrons dans un prochain article qu'une déshydratation trop poussée du pollen peut causer chez le palmier à huile la formation d'embryons anormaux.

Sublimation et désorption.

Dans nos essais, les durées de déshydratation de 1 heure (Tabl. I) et de 3 heures (Tabl. II) correspondent aux temps de sublimation, c'est-à-dire au temps nécessaire pour que le pollen passe de la température de congélation ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) à la température ambiante ou à la température de la source chaude. En pratique, la sublimation a été considérée comme terminée lorsque le pollen avait atteint 15 à $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1).

Au-delà du temps de sublimation, la désorption commence. Le tableau II montre que les pollens ne doivent pas subir une longue désorption, ils perdent alors leur pouvoir germinatif.

Mesure des taux de siccité.

Les mesures de taux de siccité sont délicates à réaliser sur de faibles quantités de produits très déshydratés (humidité atmosphérique, température, pesée...).

Les données ci-après doivent être considérées avec cette réserve.

La technique employée consiste à déshydrater les

(1) La température de sublimation correspond ici à la température moyenne du produit dont une partie a déjà été sublimée et dont l'autre est en cours de sublimation.

échantillons de pollen jusqu'à poids constant dans une étuve à + 80 °C, ce poids constant est atteint au bout de 5 heures environ. Le tableau III indique les taux de siccité de pollens lyophilisés.

Le tableau III montre que le taux de siccité qui correspond au meilleur conditionnement se situe aux alentours de 2 à 3 p. 100 d'eau sur poids sec. Il existe certainement des variations qui peuvent provenir des pourcentages différents d'humidité de pollens au moment des traitements ou de leur origine.

TABLEAU III

Taux de siccité des pollens
exprimés en p. 100 d'eau sur matière sèche

Durée de déshydratation	Pollen 1		Pollen 2	
	p. 100 eau	p. 100 germination	p. 100 eau	p. 100 germination
3 heures	1,9	42,2	2,7	29,3
5 heures	1,1	12,5	0,55	5,3
9 heures	0,3	0	0,3	0

D. — RÉHYDRATATION DES POLLENS LYOPHILISÉS

Il est apparu, lors des tests de germination, que les conditions de réhydratation jouaient un rôle important.

Un pollen de cocotier lyophilisé ne germe pas lorsqu'il est ensemencé dès l'ouverture des flacons. Le temps de réhydratation dépend du degré hygrométrique de l'air, de la température et de la siccité du pollen (Tabl. IV et Fig. 5).

Ce temps de réhydratation, pour une température de 23 °C est, comme on pouvait s'y attendre, beaucoup plus court en atmosphère saturée qu'en atmosphère insaturée et les pollens les plus secs se réhydratent plus lentement. A cette température la viabilité des pollens baisse au-delà de 24 heures.

A 6 °C, la faculté germinative est inférieure de moitié et reste stable quelle que soit la durée de réhydratation.

Avant d'utiliser un pollen de cocotier lyophilisé, il est nécessaire de le réhydrater dans une atmosphère saturée pendant au moins 2 heures et sans excéder 24 heures. Cette réhydratation ne peut être faite à de basses températures.

E. — DISCUSSION

Les difficultés rencontrées dans la mise au point de la lyophilisation des pollens proviennent de ce que trois des facteurs, qui ont chacun un caractère essentiel, doivent être respectés, d'où la nécessité de les étudier isolément.

Dans les premiers essais sur pollen de cocotier, les échecs pouvaient provenir soit de la congélation, soit de la déshydratation (sublimation et désorption), soit des mauvaises conditions de réhydratation avant mise en germination. L'idée du professeur Kovoor de plonger des pollens dans de l'azote liquide a permis de démontrer qu'en opérant à de très basses températures leur viabilité n'était apparemment pas modifiée. On pouvait alors étudier les conditions de sublimation et de désorption.

Congélation.

Nous avons décidé de travailler aux températures les plus basses possibles, à $t = -80$ °C, de façon à réaliser une congélation rapide des pollens. On admet en effet généralement que la vitesse de congélation des produits est en relation avec la taille des cristaux de glace formés qui sont d'autant plus petits que le refroidissement est rapide [4]. Les risques de lésions mécaniques sont ainsi réduits.

Par ailleurs la concentration des solutions cellulaires, qui s'accroît au fur et à mesure que se forment les cristaux de glace, peut être la cause d'altération physiologique. En congelant rapidement les pollens, on en diminue les risques.

Nous avons déterminé que les températures de sublimation se situent vers -40 °C. La technique utilisée par Whitehead n'est donc pas une lyophilisation proprement dite; le froid créé en cours d'opération (de -4 à -6 °C) n'est pas suffisant pour provoquer la congélation du produit. Il s'agit donc d'un séchage du pollen sous vide, sans sublimation.

TABLEAU IV

Evolution du pourcentage de germination d'un pollen de cocotier en fonction des conditions de réhydratation

Traitements	Temps de réhydratation	t = 6 °C hygrométrie 60 p. 100	t = 23 °C hygrométrie 40 p. 100	t = 23 °C hygrométrie 100 p. 100
Pollen lyophilisé (sans désorption).....	Temps 0		0	
	Après 2 h	15 p. 100	15 p. 100	30 p. 100
	Après 24 h	13	28	32
	Après 48 h	15	19	16
Pollen lyophilisé (désorption partielle)	Temps 0		0	
	Après 2 h	0	0	14
	Après 24 h	15	14	22
	Après 48 h (non testé)	—	—	—
C Témoin non lyophilisé conservé à -18 °C	Temps 0		35 p. 100	

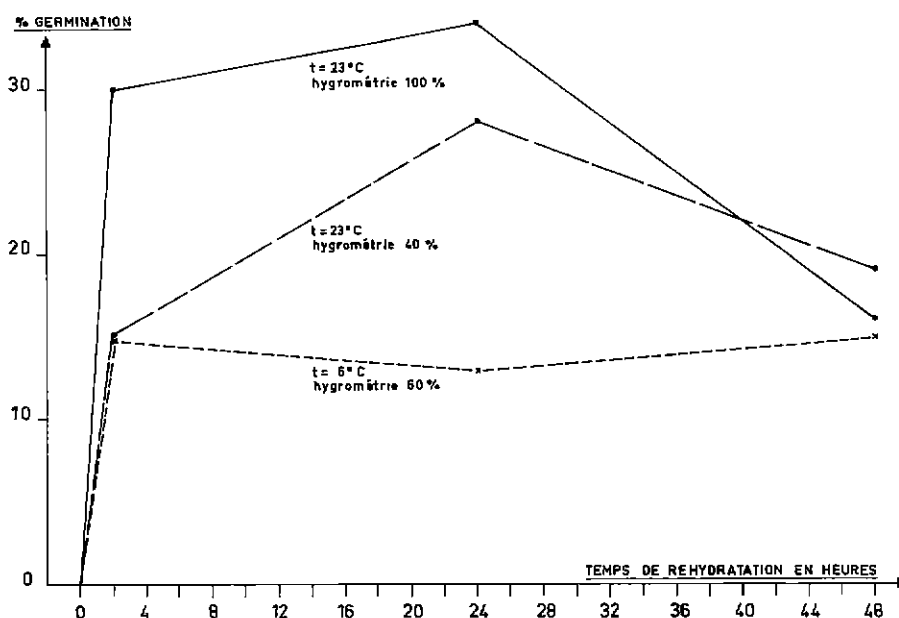


Fig. 5. — Evolution du pourcentage de germination en fonction des conditions de réhydratation.

Sublimation et désorption.

On a montré que les phénomènes de désorption diminuent la viabilité des pollens et que, d'une façon générale, la déshydratation ne doit pas aller au-delà du temps de sublimation. Ce temps ne peut être défini de façon absolue, il dépend de l'humidité des pollens et des quantités traitées.

Réhydratation des pollens lyophilisés.

La réhydratation des pollens lyophilisés de cocotier est nécessaire. Il serait intéressant de comparer les résultats obtenus par germination, sur milieu gélosé, à ce qui se passerait *in vivo* lorsque les pollens sont mis en contact avec les stigmates. On aurait ainsi une idée du rôle que joue le nectar dans les phénomènes de réhydratation.

Etudes complémentaires.

Les résultats obtenus constituent une bonne approche des conditions de lyophilisation. Les études ulté-

rieures doivent les préciser davantage. On prolongera alors tous les tests jusqu'à la réalisation de fécondations.

F. — CONCLUSIONS

La lyophilisation des pollens de cocotier peut être réalisée avec succès en respectant certaines conditions de congélation et de déshydratation.

Les pollens lyophilisés conditionnés sous vide conservent à température ambiante toutes leurs facultés germinatives. Aucune altération n'a été constatée dans nos expériences après 6 mois de stockage. Une réhydratation de quelques heures est cependant nécessaire avant leur utilisation.

L'appareil utilisé permet de traiter au moins une centaine de grammes de pollen en vrac ou 48 unités de pollens placés dans des flacons. La durée de l'opération n'excède pas en général 3 heures.

La mise au point d'une technique de lyophilisation du pollen de cocotier ouvre de nouvelles possibilités pour l'amélioration génétique de cette plante et la production de semences [5].

RÉFÉRENCES

- [1] NUCÉ DE LAMOTHE M. de et ROGNON F., 1972. — La production de semences hybrides chez le cocotier par pollinisation assistée. *Oléagineux*, 27, n° 11, p. 539-544.
- [2] WHITEHEAD R. A., 1966. — Progrès dans la lyophilisation du pollen de cocotier. *Oléagineux*, 21, n° 5, p. 281-284.
- [3] PICAULT R., 1972. — La pratique de la lyophilisation. Conférence faite à la Journée d'Etude Nouveautés en Lyophilisation.
- [4] REY L., 1960. — Traité de lyophilisation — Ed. Hermann.
- [5] FRÉMOND Y. et NUCÉ DE LAMOTHE M. de, 1971. — Le bloc d'amélioration de cocotier de Port-Bouet. *Oléagineux*, 26, n° 2, p. 71-82.

